

Untersuchungen zur Stabilisierung von
Phytochromgradienten und zur Förderung
der Schwachlichtbewegung durch Blaulicht
bei der Grünalge Mesotaenium

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Gerhard Büttner
aus Nürnberg

1925



Untersuchungen zur Stabilisierung von
Phytochromgradienten und zur Förderung
der Schwachlichtbewegung durch Blaulicht
bei der Grünalge *Mesotaenium*

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Gerhard Büttner
aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

27.06.1985

Vorsitzender der Promotions-
kommission:

Prof. Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatte:

Prof. Dr. W. Haupt

Zweitberichterstatte:

Prof. Dr. K. Seitz

Die konjugaten Grünalgen *Mougeotia* und *Mesotaenium* zeigen bei Bestrahlung mit hellrotem Licht charakteristische Schwachlichtbewegung, d.h. Drehung von Kante auf Fläche, ihres einzigen plattenförmigen Chloroplasten. Während zur Realisierung dieser Reaktion bei *Mougeotia* eine einzige, kurze Bestrahlung mit querschwingendem Hellrot ausreicht, benötigten Haupt und THIELE (1961), ebenso wie HAUPT und REIF (1978) bei *Mesotaenium* wiederholte Belichtungen, was die letztgenannten Autoren mit einer schnellen Alterung des Pfr erklärten.

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen experimentelle Möglichkeiten aufgezeigt werden, Pfr-Gradienten über längere Zeit stabil und physiologisch aktiv zu erhalten. Ferner wurde untersucht, ob Wechselwirkungen zwischen dem Phytochromsystem und einem bislang nicht näher analysierten Blaulicht-Photorezeptor bei der Schwachlichtbewegung bestehen.

Methodisch wurde die von HAUPT und REIF (1978) angewandte Präpariertechnik weiterentwickelt, indem die Agarfüllungen in den Objektträgerrähmchen durch Deckgläser (15 x 15mm) ersetzt wurden, auf denen sich die Algen schon bei der Anzucht in Petrischalen durch Gallertausscheidung festsetzten. Die Algen waren im Präparat über 72 Stunden hinweg voll reaktionsfähig. Zudem ermöglichte diese Methode Bichromatbestrahlungen der Algen mit Hellrot von oben und Blau von unten ohne wesentliche Absorptionsverluste und Streuung des Blaulichts durch die Agarfüllung.

Bei seitlicher Einstrahlung von Weißlicht drehen sich die Chloroplasten in Kantenstellung: dies bezeichnen wir als Richtbestrahlung. 90-minütige Richtdauer führt bei *Mesotaenium* zu 92% Kantenstellung (= 8% bei Flächenstellung). Überraschenderweise verlassen die Chloroplasten die Kantenstellung in einer anschließenden Dunkelpause rasch wieder und erreichen nach 2 Stunden die statistische Verteilung von

50% Kantenstellung: 50% Flächenstellung. Diese kann als Instabilität des Pfr-Gradienten interpretiert werden (Abb.1):

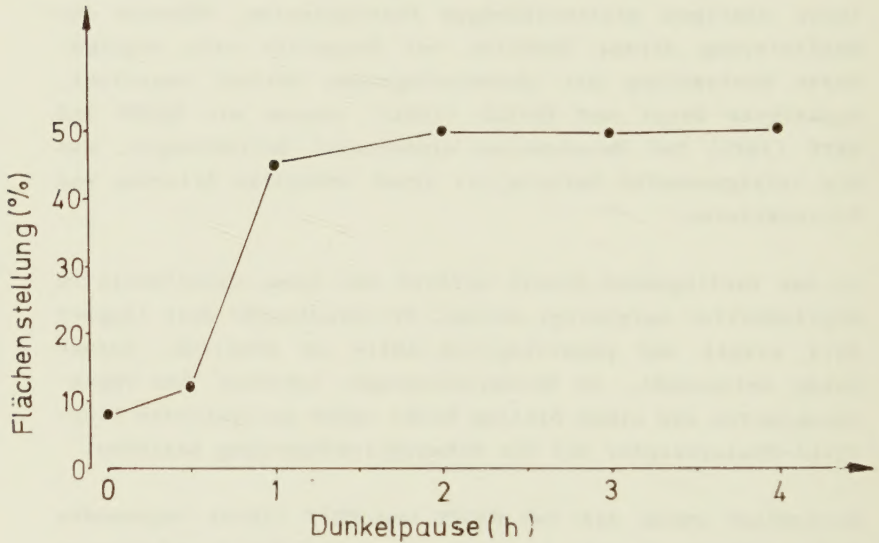


Abb. 1: Rückdrehung der Mesotaenium-Chloroplasten von Kantenstellung in die statistische Verteilung nach 90-minütiger seitlicher Weißlichteinstrahlung in einer anschließenden Dunkelpause.

Erst bei Verlängerung der Richtzeit auf 20 Stunden blieben die Kantenstellungen in einer nachfolgenden Dunkelpause weitgehend erhalten. Nachbestrahlung mit Dunkelrot nach verschiedenen langen Dunkelpausen zeigte, daß als Ergebnis der langen Richtdauer ein über viele Stunden stabiler Pfr-Gradient vorlag, der für die Beibehaltung der Chloroplastenstellung verantwortlich war.

Als besonders günstig für die Stabilisierung der Kantenstellung im Richtfeld erwies sich seitlich eingestrahktes

Weißlicht mit hohem Blauanteil. Seitliches Hellrot oder Weißlicht mit geringem Blauanteil waren wesentlich weniger wirksam.

Daraus ergab sich die Frage, ob Blau auch die Wirkung kurzer Hellrot-Belichtungen erhöhen kann.

Es ist nämlich bekannt, daß eine einzige Hellrot-Bestrahlung im Minutenbereich nur eine geringfügig induzierende Wirkung hat (HAUPT und THIELE 1961, HAUPT und REIF 1978), und diese Beobachtung konnte voll bestätigt werden. Ebenso erbrachte ein kurzer Blaulichtpuls, alleine gegeben, in unseren Versuchen keine Induktion. Zusammen mit Hellrot erzielte jedoch eine 10-minütige Blaubestrahlung 80% Reaktion. Dabei war querschwingendes Blau wirksamer als längsschwingendes Blau, was auf einen Wirkungsdichroismus bei dieser Wellenlänge hinweist.

Wurde querschwingendes Hellrot nur 1 Minute lang am Beginn der Blaulichtbelichtung gegeben, dann zeigten die Chloroplasten ebenfalls 80% Schwachlichtreaktion. Das bedeutet, daß bei zusätzlicher Gabe von Blaulicht bereits eine 1-minütige Bestrahlung mit querschwingendem Hellrot zum Ablauf der Schwachlichtbewegung bei Mesotaenium-Chloroplasten führt.

Ein über Fluenz-Effekt-Kurven erarbeitetes Wirkungsspektrum des blauen Spektralbereiches sollte Aufschluß über das Photorezeptorpigment für das Blaulicht geben (Abb. 2):

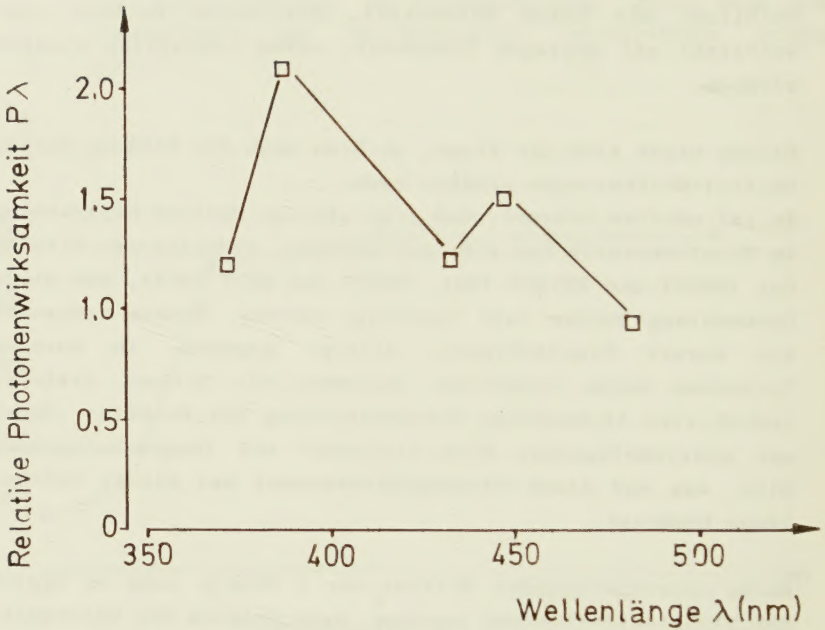


Abb.2: Bisher erarbeitete Punkte zu einem Wirkungsspektrum des blauen Spektralbereiches zwischen 370 nm und 490 nm. $P(\lambda)$ = relative Photonenwirksamkeit.

Die Lage der Maxima (bei 385 nm und 450 nm) und des Minimums (bei 435 nm) ließ auf ein Flavin als Rezeptor-Pigment für den blauen Spektralbereich schließen, wenngleich der Kurvenverlauf teilweise von den Spektren verschiedener aus Algenmaterial isolierter Flavinfractionen abweicht. Dies wird möglicherweise durch ein unbekanntes Schirmpigment hervorgerufen.

Wie ist die Blaulichtwirkung zu interpretieren?

Stabilisiert Blau den Pfr-Gradienten selbst oder wirkt es auf die durch Pfr eingeleiteten Folgereaktionen?

Zur Klärung dieser Frage wurde der Pfr-Gradient vor oder

nach der Blaugabe durch 2-minütige, saturierende Dunkelrotbestrahlung gelöscht und die Schwachlichtreaktion ausgewertet. Hellrot-Dunkelrot-Blau ergab, wie zu erwarten, keine Reaktion, Hellrot-Blau-Dunkelrot jedoch 80% Drehung. Wurde die Blaubestrahlung (Bl) durch Dunkelrot in 2 Teilbestrahlungen (Bl_1 , vor Dunkelrot, Bl_2 unmittelbar nach Dunkelrot) aufgeteilt, so erreichten wir schon nach kurzer Bl_1 -Zeit von 30 Sekunden eine starke Verminderung des Dunkelroteinflusses. Anschließendes Bl_2 erzielte 65% Schwachlichtreaktion. Nach 3 Minuten Bl_1 war praktisch keine Beeinflussung des Hellrot-Effektes durch Dunkelrot mehr möglich. Das bedeutet, daß die Chloroplastendrehung von Kante auf Fläche auch abläuft, wenn nach dem Einsetzen der Sekundärreaktionen durch Blaulicht kein Pfr-Gradient mehr vorhanden ist. Damit stabilisiert Blaulicht nicht das Pfr selbst, sondern startet schnell die Folgereaktionen, die zur Chloroplastendrehung führen.

Über die Wirkungsweise der Blaubestrahlung bestehen keine gesicherten Vorstellungen. Diskutiert wird, gestützt durch Aussagen von SEITZ (1974) und WEISENSEEL (1968a, b) eine Erhöhung der ATP-Produktion in der Zelle, die Membranpotentialänderung hervorrufen könnte und dadurch zur Herabsetzung der Plasmaviskosität führte.

Neben der Stabilisierung des Pfr-Gradienten durch 20-stündiges seitlich eingestrahlttes Weißlicht gelang uns dies auch mit Hilfe tiefer Versuchstemperatur von 5° C. Diese Untersuchungen zeigten, daß man bei intermittierenden Bestrahlungen der auf Kante gerichteten Chloroplasten durch Pulse mit querschwingendem Hellrot bei 25° C eine größere Anzahl von Induktionen benötigt als bei 5° C, um dasselbe Niveau an Schwachlichtreaktionen zu erzielen (Abb.3):

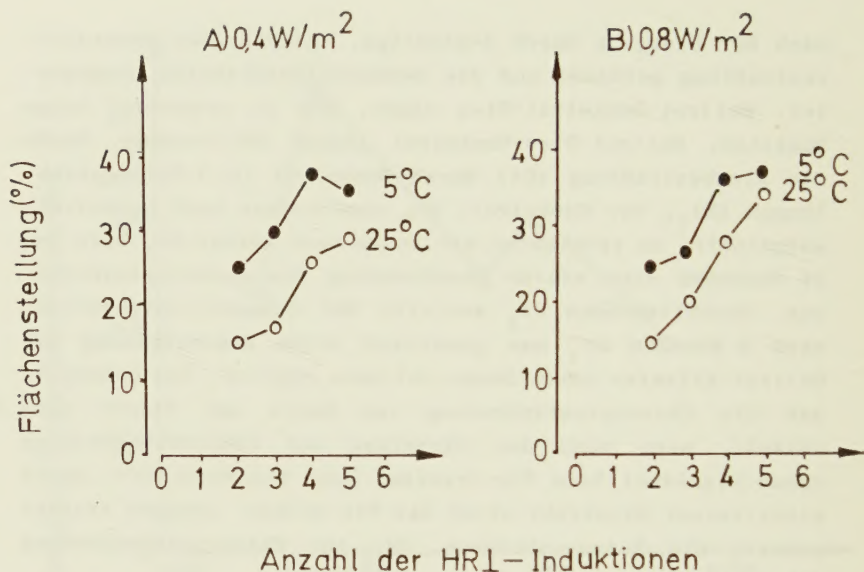


Abb.3: Wirksamkeit einer unterschiedlichen Anzahl von Induktionen mit querschwingendem Hellrot im Vergleich bei 25°C und 5°C . Hellrotfilter = AL 665; Zeitabstand zwischen den Induktionen = 8 Minuten.
Die Bestrahlungsstärke der Einzelinduktionen ist über den Kurven angegeben.
Die Algen wurden vor Induktionsbeginn 20 Stunden in seitlichem Weißlicht bei 5°C bzw. 25°C gerichtet.

Dabei wurde die Drehfähigkeit der Chloroplasten durch die tiefe Versuchstemperatur kaum beeinflusst. Wir erklären diese Ergebnisse damit, daß die schnelle Pfr-Alterung, d.h. ein Verlust der physiologischen Wirksamkeit des Pfr (was HAUPT und REIF 1978 fanden), in der Dunkelpause nach Induktion mit querschwingendem Hellrot bei 5°C stark verlangsamt abläuft.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten wir deutlich machen, daß Blaulicht im Zusammenwirken mit querschwingendem Hellrot wesentlich ist für den Ablauf der Schwachlichtbewegung des Mesotaenium-Chloroplasten. Als tonischer Faktor setzt Blau nach kurzer Belichtung mit querschwingendem Hellrot sehr schnell (im Sekunden- bis Minutenbereich) Reaktionen in Gang, die mit Dunkelrot nicht mehr reversibel sind und trotz Abwesenheit des durch Dunkelrotbestrahlung zerstörten Pfr-Gradienten zur Schwachlichtreaktion führen. Blaulicht zeigt dabei einen deutlichen Wirkungsdichroismus. Als Blaulichtrezeptor wird von uns ein Flavin diskutiert.

Eine Stabilisierung des Pfr-Gradienten in Mesotaenium konnten wir einerseits durch Einstrahlung von 20-stündigem seitlichen Weißlicht mit hohem Blauanteil, andererseits durch tiefe Versuchstemperatur von 5° C herbeiführen. Im niederen Temperaturbereich wird anscheinend die Pfr-Alterung erheblich verzögert, die Drehfähigkeit der Chloroplasten jedoch kaum beeinflußt.

Literaturverzeichnis

=====

HAUPT, W.; REIF, G. 1978

"Aging" of phytochrome Pfr in MESOTAENIUM

Zeitschr. f. Pflanzenphysiol. 92, 153-161

HAUPT, W.; THIELE, R. 1961

Chloroplastenbewegung bei MESOTAENIUM

Planta 56, 388-401

SEITZ, K. 1974

Lichtabhängige Orientierungsbewegungen und ihre Regelung.

Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87, 195-206

WEISENSEEL, M. 1968 a

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf
lichtinduzierte Chloroplastenverlagerungen.

I.) Die Wirkung verschiedener Lichtintensitäten auf die
Chloroplastenanordnung und ihre Abhängigkeit von der Tempe-
ratur.

Zeitschr. f. Pflanzenphysiol. 59, 56-69

WEISENSEEL, M. 1968 b

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf
lichtinduzierten Chloroplastenverlagerungen

II.) Die statistische Bewegungsgeschwindigkeit der Chloro-
plasten und ihre Abhängigkeit von der Temperatur.

Zeitschr. f. Pflanzenphysiol. 59, 153-171

LEBENS LAUF

- 02.04.1952: Geboren als Sohn des Anzeigenvertreters Erich Büttner und seiner Ehegattin Elisabeth Büttner, geb. Nübler.
- 15.09.1958: Eintritt in die Volksschule in Zirndorf/Krs. Fürth.
- 15.09.1962: Übertritt in das Hardenberg-Gymnasium Fürth/Bay.
- 19.06.1971: Dort die Reifeprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig abgelegt.
- 15.11.1971: Beginn des Biologiestudiums mit Studienziel Diplom an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- 17.03.1978: Diplom-Biologen-Hauptprüfung mit Erfolg abgelegt. Thema der Diplomarbeit: Biochemische Untersuchungen zur Eisensubstitution in Häm.
- 01.05.1978: Beginn der Promotionsarbeit am Botanischen Institut derselben Universität in der Fachrichtung Photobiologie. Thema der Dissertation: Untersuchungen zur Stabilisierung von Phytochromgradienten und zur Förderung der Schwachlichtbewegung durch Blaulicht bei der Grünalge *Mesotaenium*. Abschluß des experimentellen Teils zum 31.12.1981.
- 11.08.1978: Eheschließung mit der Erzieherin Gerda Gorka.
- 07.01.1982: Geburt unserer Tochter Anja.
- 01.04.1982: Eintritt in die Firma Hoechst AG, Frankfurt, als wissenschaftlicher Referent im pharmazeutischen Klinikaußendienst.



